


## Microscope

**Patent number:** DE10045837  
**Publication date:** 2002-04-25  
**Inventor:** BEWERSDORF JOERG (DE); GUGEL HILMAR (DE)  
**Applicant:** LEICA MICROSYSTEMS (DE)  
**Classification:**  
 - international: **G02B21/06; G02B21/18; G02B21/06; G02B21/18;**  
 (IPC1-7): G02B21/06  
 - european: G02B21/06; G02B21/18  
**Application number:** DE20001045837 20000914  
**Priority number(s):** DE20001045837 20000914

Also published as:

 US2002030886 (A1)

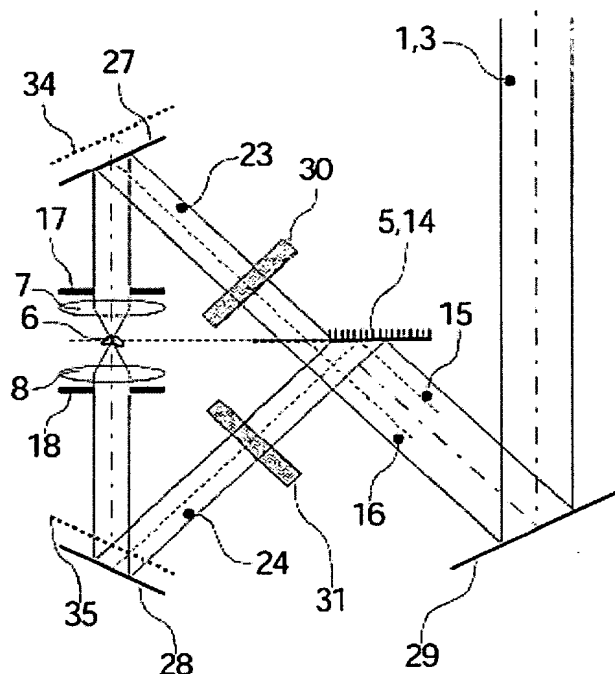
[Report a data error here](#)

Abstract not available for DE10045837

Abstract of corresponding document: **US2002030886**

The present invention concerns a microscope having an illuminating beam path (1) of a light source (2), a detected beam path (3) of a detector (4), a component (5) combining the detected beam path (3), and at least two microscope objectives (7, 8) directed onto the specimen (6). In order to achieve enhanced detection efficiency, the present invention is characterized in that an optical component (14) arranged in the beam path (1, 3) has the property of acting on a portion of the illuminating and/or detected beam cross section in such a way that the combined detected light (15, 16) is guided in largely lossless fashion to the detector (4).

Alternatively thereto, the microscope according to the present invention is characterized in that a polarizing beam splitter (19), arranged in the beam path (1, 3) and acting on the entirety of the illuminating and/or detected beam cross section, is provided.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

Best Available Copy



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 100 45 837 A 1

61 Int. Cl. 7:  
G 02 B 21/06

21 Aktenzeichen: 100 45 837.8  
22 Anmeldetag: 14. 9. 2000  
43 Offenlegungstag: 25. 4. 2002

DE 100 45 837 A 1

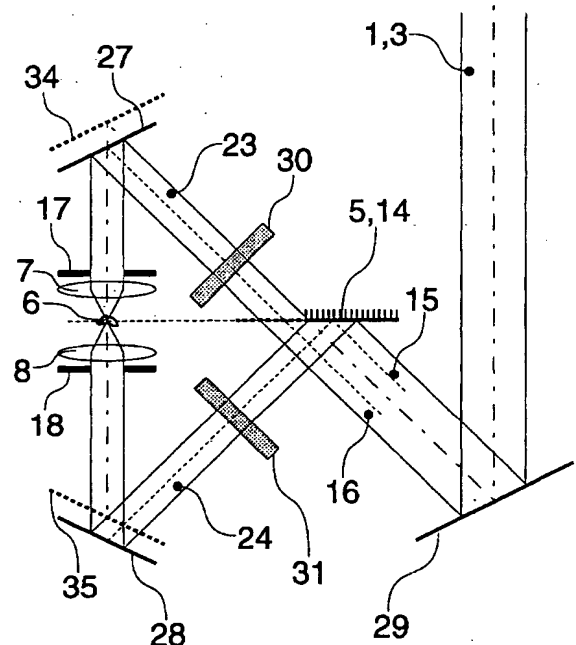
71 Anmelder:  
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 68165  
Mannheim, DE  
74 Vertreter:  
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

72 Erfinder:  
Bewersdorf, Jörg, 69121 Heidelberg, DE; Gugel,  
Hilmar, 69221 Dossenheim, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Mikroskop

57 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Mikroskop mit einem Beleuchtungsstrahlengang (1) einer Lichtquelle (2), einem Detektionsstrahlengang (3) eines Detektors (4), einem den Detektionsstrahlengang (3) vereinigenden Bauteil (5) und mindestens zwei auf das Objekt (6) gerichtete Mikroskopobjektive (7, 8). Das erfindungsgemäße Mikroskop ist zur Realisierung einer erhöhten Detektionseffizienz, insbesondere bei maximalem Auflösungsvermögen, dadurch gekennzeichnet, dass ein im Strahlengang (1, 3) angeordnetes optisches Bauteil (14) in seiner Eigenschaft auf einen Teil des Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlquerschnitts derart wirkt, dass das vereinigte Detektionslicht (15, 16) weitgehend verlustfrei zum Detektor (4) geleitet wird. Alternativ hierzu ist das erfindungsgemäße Mikroskop dadurch gekennzeichnet, dass ein im Strahlengang (1, 3) angeordneter und auf den gesamten Teil des Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlquerschnitts wirkender Polarisationsstrahlteiler (19) vorgesehen ist.



DE 100 45 837 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Mikroskop mit einem Beleuchtungsstrahlengang einer Lichtquelle, einem Detektionsstrahlengang eines Detektors, einem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil und mindestens zwei auf das Objekt gerichtete Mikroskopobjektive.

[0002] Mikroskope der gattungsbildenden Art, insbesondere Mikroskope, bei denen zwei auf das Objekt gerichtete Mikroskopobjektive vorgesehen sind, sind seit geraumer Zeit aus der Praxis bekannt.

[0003] Aus der US 4,621,911 ist beispielsweise ein Wellenfeldmikroskop bekannt, bei dem durch Interferenz zweier kollimiert verlaufender Lichtstrahlen ein zur Beleuchtung eines Objekts dienendes Wellenfeld aufgebaut wird. Dieses Wellenfeld weist parallel zur Fokalebene der Mikroskopobjektive ausgerichtete Ebenen gleicher Beleuchtungsintensität auf, wobei die Beleuchtungsintensität von einem maximalen Beleuchtungswert zu einem minimalen Beleuchtungswert variiert, wobei die alternierende Beleuchtungsvariation periodisch entlang der optischen Achse der Mikroskopobjektive fortgesetzt ist. Mit diesem interferometrischen Beleuchtungsverfahren können Fluoreszenzobjekte entsprechend dem Beleuchtungsmuster zur Fluoreszenz angeregt werden, wodurch eine Auflösungsverbesserung erzielbar ist.

[0004] Aus der EP 0 491 289 A1 ist ein doppelkonfokales Rastermikroskop bekannt, bei dem ein Objekt von zwei einander entgegengesetzt angeordneten Mikroskopobjektiven punktförmig beleuchtet wird. Durch diese beidseitige Beleuchtung bildet sich ebenfalls ein Interferenzmuster aus, so dass auch hierdurch eine Erhöhung des axialen Auflösungsvermögens erzielt werden kann.

[0005] Aus der US 5 671 085 ist ein Mikroskop bekannt, das ebenfalls ein Objekt mit zwei einander entgegengesetzt angeordneten Mikroskopobjektiven mit einer Hellfeld-Auflicht-Beleuchtung zur Fluoreszenz anregt. Auch hierbei kann das Beleuchtungs- und/oder das Detektionslicht zur Interferenz gebracht werden, wodurch sich ebenfalls axiale Auflösungsverbesserungen erzielen lassen.

[0006] Aus der DE 196 29 725 A1 ist ein Doppelobjektiv-System für ein Mikroskop, insbesondere für ein Rastermikroskop, bekannt. Hierbei sind zwei Mikroskopobjektive vorgesehen, die auf das Objekt gerichtet sind und deren optische Achse einen Winkel einschließt, der etwa 90 Grad beträgt. Mit diesem Doppelobjektiv-System können insbesondere Fluoreszenzobjekte mit einem punktförmigen Beleuchtungsmuster nahezu isotroper Form zur Fluoreszenz angeregt werden. Auch hierbei können Auflösungsverbesserungen erzielt werden.

[0007] Die Mikroskope der gattungsbildenden Art sind jedoch im Hinblick auf die Detektionseffizienz problematisch, da das von beiden Objektiven eingesammelte Objektlicht mit Hilfe eines Strahlteilers vereinigt wird, an dem ca. 50% des von jeweils einem Objektiv kommenden Detektionslichts verloren geht. Grund hierfür ist der Einsatz beispielsweise eines 50 : 50 Strahlteilers, bei dem nur die halbe Intensität jedes Detektionslichtstrahls in Richtung des Detektors gelangen kann, für die andere Hälfte des zu detektierenden Lichts ist eine geeignete Zuführung zu dem Detektor nicht möglich. Somit ist zwar das Auflösungsvermögen eines der oben genannten gattungsbildenden Mikroskope erhöht, jedoch ist die Detektionseffizienz nicht höher als bei der Verwendung eines einzelnen Mikroskopobjektivs. Da jedoch insbesondere bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ein erhöhtes Auflösungsvermögen mit einem kleineren Beleuchtungsvolumen einhergeht, stammt das vom Objekt kommende Fluoreszenzlicht aus einem kleineren Be-

leuchtungsvolumen, so dass in diesem geringeren Beleuchtungsvolumen auch weniger Fluoreszenzmoleküle angeregt werden und dementsprechend die emittierte Fluoreszenzlichtleistung verringert ist. Hierdurch verringert sich die Fluoreszenzphotonenausbeute und damit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

[0008] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Mikroskop der gattungsbildenden Art derart anzugeben und weiterzuentwickeln, dass eine erhöhte Detektionseffizienz, insbesondere bei maximalem Auflösungsvermögen, realisiert werden kann.

[0009] Das erfindungsgemäße Mikroskop der gattungsbildenden Art löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. Danach ist ein solches Mikroskop dadurch gekennzeichnet, dass ein im Strahlengang angeordnetes optisches Bauteil in seiner Eigenschaft auf einen Teil des Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlquerschnitts derart wirkt, dass das vereinigte Detektionslicht weitgehend verlustfrei zum Detektor geleitet wird.

[0010] Erfindungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass der Verlust von ca. 50% des Detektionslichts, der an dem herkömmlichen den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil auftritt, vermieden werden kann, wenn das den Strahlengang vereinigende Bauteil derart im Strahlengang angeordnet ist, dass es nur teilweise auf den gesamten Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlquerschnitt wirkt. Hierdurch kann das von einem Mikroskopobjektiv kommende Detektionslicht das den Detektionsstrahlengang vereinigende optische Bauteil nahezu verlustfrei passieren, wohingegen das von dem anderen Mikroskopobjektiv kommende Detektionslicht an dem optischen Bauteil reflektiert wird. Für den Fall, dass Beleuchtungs- und Detektionsstrahl bei dem optischen Bauteil nahezu identisch verlaufen, wird das Beleuchtungslicht entsprechend dem verlaufenen Teil des optischen Bauteils zur Objektbeleuchtung zu den Mikroskopobjektiven geleitet. Insbesondere bei einem doppelkonfokalen Rastermikroskop müssen aufgrund der besonderen Anordnung des das Detektionslichts vereinigenden Bauteils die Spiegel, die das Beleuchtungs- bzw. Detektionslicht üblicherweise in Richtung der Mikroskopobjektive reflektieren, an einer anderen Stelle positioniert werden. Hierdurch wird gewährleistet, dass der maximal zu Verfügung stehende Strahlquerschnitt auch zum Ausbleichen der Eintrittspupillen der Mikroskopobjektive nutzbar ist.

[0011] In einer bevorzugten Ausführungsform ist insbesondere zur Ausbildung optimaler Beleuchtungsinterferenzmuster bzw. Detektionsinterferenzerscheinungen vorgesehen, dass der wirksame Teil des optischen Bauteils im wesentlichen 50% des Gesamtstrahlquerschnitts beeinflusst. Somit wird beispielsweise zur Beleuchtung zu jedem Mikroskopobjektiv im wesentlichen die gleiche Lichtmenge geleitet, so dass sich die im Objektbereich überlagernden, aus verschiedenen Richtungen kommenden Lichtstrahlen zur Interferenz überlagern können. Nur wenn die Lichtintensität der beiden Lichtstrahlen annähernd gleich ist, kann eine maximale Modulationsstärke erzielt werden, d. h. völlige Auslöschung bzw. maximale Verstärkung.

[0012] Im Konkreten könnte das optische Bauteil einen Spiegel, einen dichroitischen Strahlteiler und/oder einen Polarisationsstrahlteiler umfassen. Im einfachsten Fall könnte ein Spiegel vorgesehen sein, der in seiner Eigenschaft als Spiegel auf ca. 50% des Gesamtstrahlquerschnitts wirkt. Die Verwendung eines dichroitischen Strahlteilers oder eines Polarisationsstrahlteilers würde eine selektive Wirkungsweise des optischen Bauteils zur Folge haben. Ein dichroitischer Strahlteiler könnte beispielsweise lediglich auf den Detektionsstrahlengang wirken, wenn er nämlich hinsichtlich der verwendeten Wellenlänge des Beleuchtungslichts

einen hohen Transmissionswert und hinsichtlich des Detektionslichts einen hohen Reflexionswert aufweist. Das optische Bauteil könnte auch beispielsweise zur einen Hälfte aus einem Spiegel und zur anderen Hälfte aus einem Polarisationsstrahlteiler bestehen. In diesem Fall würde die eine Hälfte in ihrer Eigenschaft als Spiegel auf den Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlquerschnitt, die andere Hälfte entsprechend als Polarisationsstrahlteiler wirken. Hierdurch könnte sich beispielsweise ein Polarisationsmikroskop mit erhöhter Detektionseffizienz realisieren lassen. [0013] Das optische Bauteil könnte nur zum Teil beschichtet bzw. verspiegelt sein, nämlich nur zu einem dem wirksamen Anteil entsprechenden Teil. Im Konkreten könnte das optische Bauteil aus einer teilweise verspiegelten Glasplatte bzw. eines teilweise verspiegelten oder teilweise beschichteten Substrats bestehen.

[0014] Ein nahezu optimales Beleuchtungsmuster kann erzielt werden, wenn das optische Bauteil den Beleuchtungslichtstrahl derart aufteilt, dass die Eintrittspupillen der Mikroskopobjektive weitgehend ausgeleuchtet werden. Hierzu könnte beispielsweise der Beleuchtungsstrahldurchmesser entsprechend vergrößert werden, so dass die gesamten Eintrittspupillen der Mikroskopobjektive ausgeleuchtet und hinsichtlich der Objektbeleuchtung somit die maximale Beleuchtungsapertur der Mikroskopobjektive ausgenutzt wird.

[0015] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das optische Bauteil derart im Strahlengang angeordnet, dass das vom Objekt kommende Detektionslicht nach dem optischen Bauteil zumindest weitgehend parallel verläuft. In dieser parallel verlaufenden Detektionslichtrichtung wäre sinngemäß ein entsprechender Detektor anzuordnen. Eine nahezu verlustfreie Detektion des vom Objekt kommenden Detektionslichts wäre in besonders vorteilhafter Weise die Folge dieser Maßnahme. Hierdurch kann beispielsweise bei einer doppelkonfokalen Rastermikroskopanordnung bei verkleinertem Beleuchtungsvolumen dennoch eine maximale Detektionslichtausbeute bzw. ein maximales Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzielt werden.

[0016] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das optische Bauteil in einer korrespondierenden Ebene einer zur Eintrittspupille mindestens eines Mikroskopobjektivs angeordnet. Falls es sich um ein Rastermikroskop handelt, bei dem zum Abrastern des Objekts der Lichtstrahl abgelenkt wird, wird in einer zur Eintrittspupille korrespondierenden Ebene der Lichtstrahl lediglich gekippt und nicht quer zur Ausbreitungsrichtung ausgelenkt. Dementsprechend ist der wirksame Anteil des optischen Bauteils auf den Beleuchtungs- bzw. Detektionsstrahlquerschnitt dann konstant, wenn das optische Bauteil in einer korrespondierenden Ebene zur Eintrittspupille angeordnet ist.

[0017] Das erfindungsgemäße Mikroskop der gattungsbildenden Art löst die eingangs genannte Aufgabe alternativ durch die Merkmale des Patentanspruchs 9. Danach ist ein solches Mikroskop dadurch gekennzeichnet, dass ein im Strahlengang angeordneter und auf den gesamten Teil des Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlquerschnitts wirkender Polarisationsstrahlteiler vorgesehen ist.

[0018] Erfindungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass eine effiziente Detektionslichtausbeute mit einem gattungsbildenden Mikroskopaufbau auch im Transmissionslicht-Modus möglich ist, wenn das zur Beleuchtung des Objekts dienende Beleuchtungslicht nahezu vollständig das Objekt von einem Mikroskopobjektiv aus beleuchtet, und das Detektionslicht nahezu ausschließlich von dem anderen Mikroskopobjektiv aufgesammelt und zum Detektor geleitet wird. Der Polarisationsstrahlteiler wird hierbei an der Stelle des optischen Bauteils in den optischen Strahlengang

eingebraucht, an der der Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlengang geteilt bzw. vereinigt wird. Der Polarisationsstrahlteiler wirkt hierbei auf den gesamten Teil des Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlquerschnitts. Wenn das Licht der Lichtquelle linear polarisiert ist und die Polarisationsrichtung des Polarisationsstrahlteilers hiermit identisch ist, kann das Beleuchtungslicht den Polarisationsstrahlteiler nahezu ungehindert passieren. Dieses Beleuchtungslicht wird sodann über ein Mikroskopobjektiv zur Beleuchtung des Objekts geleitet und kann bei entsprechender Anordnung des zweiten Mikroskopobjektivs dieses durchlaufen, um über entsprechende Umlenkspiegel auf den Polarisationsstrahlteiler erneut zu treffen, wo es ebenfalls den Polarisationsstrahlteiler passieren kann, um somit aus dem Gesamtstrahlengang auszutreten. Eine entgegengesetzte Umlaufrichtung des Beleuchtungslichts ist durch die Verwendung des Polarisationsstrahlteilers bei geeigneter Ausrichtung der Polarisationsrichtung des Beleuchtungslichts weitgehend wirksam vermieden, da das von der Lichtquelle kommende und direkt auf den Polarisationsstrahlteiler auftreffende Licht an diesem nahezu nicht reflektiert wird.

[0019] In einer bevorzugten Ausführungsform ist zwischen der Lichtquelle und dem Strahlteiler eine  $\lambda/2$ -Platte angeordnet, die im wesentlichen 50% des Strahlquerschnitts beeinflusst. Demgemäß wird der halbe Querschnitt des Beleuchtungsstrahls einer Phasen- bzw. Polarisationsveränderung unterzogen, die 90 Grad beträgt. In besonders vorteilhafter Weise ist die  $\lambda/2$ -Platte in einer korrespondierenden Ebene zu einer Eintrittspupille mindestens eines Mikroskopobjektivs angeordnet. Bei strahlableitenden Mikroskopsystemen tritt in einer korrespondierenden Ebene zu einer Eintrittspupille mindestens eines Mikroskopobjektivs keine laterale Strahlableitung auf, dort wird der Strahl lediglich verkippt. Demgemäß würde eine zwischen Lichtquelle und Strahlteiler angeordnete, im wesentlichen zur Hälfte des Strahlquerschnitts wirkende  $\lambda/2$ -Platte in allen Strahlableitungszuständen in vorteilhafter Weise vom gleichen Strahlquerschnitt durchsetzt werden.

[0020] Mit diesem erfindungsgemäßen Mikroskop ist ein Transmissions-Dunkelfeld-Polarisationsmikroskop realisiert, denn das gesamte, in seiner Polarisationsrichtung nicht beeinflusste Beleuchtungslicht wird aus dem Beleuchtungsstrahlengang am Polarisationsstrahlteiler ausgeblendet. Lediglich der Anteil des Lichts, dessen Polarisationszustand vom Objekt verändert bzw. beeinflusst wurde wird an dem Polarisationsstrahlteiler reflektiert und verläuft in entgegengesetzter Richtung zum Beleuchtungsstrahlengang und verbleibt somit im Mikroskopstrahlengang.

[0021] In besonders vorteilhafter Weise ist mindestens ein die Polarisationsrichtung beeinflussendes Mittel in einem Strahlengangabschnitt zwischen Strahlteiler und einem Mikroskopobjektiv vorgesehen. Im Konkreten könnte das Mittel eine  $\lambda/2$ -Platte oder zwei  $\lambda/4$ -Platten umfassen, im letzteren Fall könnte eine  $\lambda/4$ -Platte jeweils in einem Strahlengangabschnitt angeordnet sein. Hierdurch wird die Polarisationsrichtung des Beleuchtungslichts beim Durchlaufen des aufgeteilten Strahlengangs bei einer Verwendung einer  $\lambda/2$ -Platte oder zweier  $\lambda/4$ -Platten um 90 Grad gedreht, so dass das die Mikroskopobjektive durchlaufende Beleuchtungslicht nunmehr am Polarisationsstrahlteiler reflektiert wird und somit im Strahlengang verbleibt. Durch diese Maßnahme ist ein Transmissions-Polarisationsmikroskop im Hellfeld-Modus realisiert, lediglich Licht, das in seiner Polarisationsseigenschaft vom Objekt beeinflusst wird, tritt aus dem Strahlengang aus.

[0022] Die aus dem Strahlengang austretenden Komponenten – mit oder ohne Verwendung von die Polarisationsrichtung beeinflussenden Mitteln im Strahlengangabschnitt

– könnten mit einem entsprechenden Detektor detektiert werden, wobei der Detektor bezüglich des einen Mikroskopobjektivs durchlaufenden Lichts in Transmissionsrichtung am Polarisationsstrahlteiler angeordnet ist.

[0023] Zur Detektion des den Strahlengang einmal durchlaufenden Beleuchtungslicht ist zwischen dem Detektor und der  $\lambda/2$ -Platte ein weiterer Strahlteiler angeordnet, über den das vom Objekt kommende Licht detektierbar ist. Insbesondere kann es sich bei diesem Strahlteiler ebenfalls um einen Polarisationsstrahlteiler handeln.

[0024] In einer konkreten Ausführungsform ist vorgesehen, dass im Strahlengang anzuordnende Filter und die Polarisation beeinflussende Mittel in dem Strahlteiler integrierbar sind. Diese Vorgehensweise führt zu einer kompakten Bauweise und zu einem geringen Justieraufwand. Im Allgemeinen wird es jedoch nicht möglich sein, alle im Strahlengang vorgesehenen Filter und Polarisation beeinflussende Mittel in den Strahlteiler zu integrieren.

[0025] Als Lichtquelle für das erfindungsgemäße Mikroskop ist mindestens ein Laser vorgesehen. Hierbei könnte es sich um einen Gaslaser, Festkörperlaser, Diodenlaser oder Faserlaser handeln. Die Verwendung eines OPO's (Optisch parametrisierter Oszillator) wäre ebenfalls denkbar. Insbesondere zur Mehrphotonen-Fluoreszenzanregung geeigneter Fluoreszenzmarker ist vorgesehen, eine Laserlichtquelle einzusetzen, die gepulstes Licht emittiert.

[0026] Weiterhin könnte als Lichtquelle eine Lampe dienen, die üblicherweise in der konventionellen Mikroskopie zu Beleuchtungszwecken eingesetzt wird. Hierbei könnte es sich um eine Quecksilber- oder Xenon-Hochdruckdampflampe handeln.

[0027] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Beleuchtungslicht mit einem oder zwei Mikroskopobjektiven in das Objekt fokussiert. Hierbei könnte es sich im Konkreten um eine konfokale Beleuchtung bzw. um eine konfokale Beleuchtung und Detektion handeln. Zur Abtastung eines dreidimensional ausgedehnten Objekts ist vorgesehen, dass durch Ablenkung des Beleuchtungslichtstrahls der Beleuchtungsfokus relativ zum Objekt bewegt werden kann. Die Strahlablenkung wird hierbei von einer Strahlablenkvorrichtung durchgeführt. In Abhängigkeit des aktuellen Ablenkzustands der Strahlablenkvorrichtung wird der detektierte Lichtintensitätswert einer entsprechenden Ortskoordinate zugewiesen, wodurch ein zwei- bzw. dreidimensionales Bild des Objekts aufgenommen bzw. abgespeichert werden kann. Alternativ zur Ablenkung des Beleuchtungsstrahls könnte auch das Objekt relativ zu dem Beleuchtungsfokus bewegt werden, indem beispielsweise der das Objekt aufnehmende Mikroskoptisch mäanderförmig in zwei unterschiedliche Richtungen bewegt wird. Hierbei wird der gemessene Intensitätswert des vom Objekt kommenden Lichts der Ortskoordinate zugewiesen, die der momentanen Tischposition entspricht.

[0028] In einer alternativen Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Beleuchtungslicht eine Objektebene ausleuchtet. Hierbei handelt es sich um eine Hellfeld-Beleuchtung, die in Form einer Köhler-Beleuchtung realisiert sein könnte. Dementsprechend könnte die Detektion ebenfalls flächenförmig erfolgen.

[0029] Für beide Beleuchtungs- bzw. Detektionsausführungsformen ist vorgesehen, dass das detektierte Licht Reflexions-, Transmissions- und/oder Fluoreszenzlicht ist. Das Fluoreszenzlicht könnte mit Prozessen der Mehrphotonen-Fluoreszenzanregung erzeugt worden sein. Das Reflexions- bzw. Transmissionslicht könnte in Abhängigkeit der Polarisationseigenschaften detektiert werden, so dass ein Polarisationsmikroskopmodus möglich ist.

[0030] Als flächenförmiger Detektor könnte eine einen

CCD-Chip aufweisende Kamera dienen. Für eine zeilenförmige Beleuchtung bzw. Detektion könnte eine CCD-Zeile als Detektor dienen. Eine punktförmige Detektion könnte mit einem Photomultiplier, einer Photodiode und/oder einer Avalanche-Photodiode erfolgen.

[0031] Die Mikroskopobjektive könnten bezüglich des Objekts oder einer gemeinsamen Fokalebene einander entgegengesetzt angeordnet sein. Hierdurch wären Mikroskope gemäß den aus den US 4,621,911, EP 0 491 289 A1 und US 5,671,085 bekannten Mikroskopanordnungen realisierbar. In einer Alternative hierzu könnten die Mikroskope derart angeordnet sein, dass die optische Achse zweier Mikroskopobjektive zueinander einen Winkel einschließen, der zwischen 0 und 180 Grad liegt. Hierdurch wäre eine aus der DE 196 29 725 A1 bekannte Mikroskopanordnung realisierbar.

[0032] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Mikroskop als Rastermikroskop, vorzugsweise als konfokales Rastermikroskop ausgeführt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Mikroskop als ein doppelkonfokales Rastermikroskop ausgeführt, wie es beispielsweise grundsätzlich aus der EP 0 491 289 A1 bekannt ist. Eine Ausgestaltung des Mikroskops in Form eines Wellenfeldmikroskops, wie es beispielsweise aus der US 4,621,911 bekannt ist oder eines I<sup>2</sup>M-, I<sup>3</sup>M- oder eines I<sup>2</sup>M-Mikroskops, wie es beispielsweise aus der US 5,671,085 bekannt ist, wäre ebenfalls denkbar. Weiterhin könnte das Mikroskop als ein Theta-Mikroskop ausgeführt sein, wie es aus der DE 196 29 725 A1 bekannt ist.

[0033] Zur Erzeugung von Interferenzen ist vorgesehen, dass die Kohärenzlänge des Beleuchtungs- und/oder Detektionslichts größer oder gleich der Weglängendifferenz zwischen den jeweiligen Strecken vom Mikroskopobjektiv zum optischen Bauteil bzw. Strahlteiler ist. Dies ist üblicherweise bei der Verwendung eines Lasers als Laserlichtquelle der Fall, da die meisten Laser eine Kohärenzlänge von ca. 1 m oder größer aufweisen. Falls als Lichtquelle eine konventionelle Lampe, beispielsweise eine Quecksilber-Hochdruckdampflampe, eingesetzt wird, müssten zum Erzeugen von Beleuchtungsinterferenzen die optischen Wege der beiden Teilstrahlengänge nahezu gleich lang sein, sie dürften sich in ihrer Weglänge um maximal ca. 1  $\mu$ m unterscheiden.

[0034] Falls keine Interferenzen des Beleuchtungs- und/oder Detektionslichts erzeugt werden sollen, ist die Kohärenzlänge des Beleuchtungs- und/oder Detektionslichts kleiner der Weglängendifferenz zwischen den jeweiligen Strecken vom Mikroskopobjektiv zum optischen Bauteil bzw. Strahlteiler.

[0035] Ganz allgemein könnte der Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlengang auf die Kohärenzeigenschaften des Beleuchtungs- und/oder Detektionslichts abstimmbar sein. Üblicherweise werden die Kohärenzeigenschaften des Beleuchtungs- und/oder Detektionslichts bei der Konzeption des Strahlengangs in der Entwicklungsphase des Mikroskopsystems berücksichtigt. Falls nachträglich eine weitere Lichtquelle an ein bestehendes System adaptiert wird, die abweichende Kohärenzeigenschaften aufweist, ist die Möglichkeit einer Abstimmbarkeit des Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlengangs auf die Kohärenzeigenschaften der neuen Lichtquelle äußerst vorteilhaft. Im Konkreten könnten verschiebbar angeordnete Spiegel und optische Bauteile vorgesehen sein, die eine Abstimmung der Strahlengänge in einem gewissen Maß erlauben.

[0036] In einem Strahlengangabschnitt zwischen optischem Bauteil bzw. Strahlteiler und Mikroskopobjektiv ist vorgesehen, dass mindestens ein phasenveränderndes Mittel angeordnet ist. Mit Hilfe dieses phasenverändernden Mittels kann insbesondere bei einem Interferenzmikroskopaufbau

die Phasenlage des den einen Strahlengangabschnitt durchlaufenden Lichts relativ zur Phasenlage des den anderen Strahlengangabschnitt durchlaufenden Lichts verändert werden. Hierdurch kann beispielsweise das Beleuchtungsinferenzmuster derart beeinflusst werden, dass im Objektbereich oder in der Fokalebene konstruktive Interferenz vorliegt. Zusätzlich oder alternativ könnte ein phasenveränderndes Mittel vorgesehen sein, mit dem die Phasenbeziehung des Beleuchtungs- und/oder Detektionslichts für unterschiedliche Punkte in der Fokalebene veränderbar ist. Dieses phasenverändernde Mittel ist in erster Linie für Mikroskopaufbauten relevant, die eine gesamte Objektebene beleuchten bzw. detektieren, wie das beispielsweise bei dem Wellenfeldmikroskop oder dem I<sup>3</sup>M-, I<sup>3</sup>M- oder I<sup>2</sup>M-Mikroskop der Fall ist.

[0037] Eine Feinjustage des Gesamtstrahlengangs könnte beispielsweise mit Hilfe mindestens einer Einrichtung zum definierten Verschieben und/oder Verkippen eines Mikroskopobjektivs erfolgen. Hierbei könnte ein Mikroskopobjektiv relativ zu dem anderen in X-, Y- und Z-Richtung verschiebbar sein und bezüglich seiner optischen Achse um zwei senkrecht zueinander stehenden Richtungen verkippbar angeordnet sein. Die Verschiebung bzw. Verkipfung eines Mikroskopobjektivs könnte mit Hilfe von Piezoelementen erfolgen.

[0038] Zur Korrektur der im Strahlengang eingefügten und auf diesen nur teilweise wirkenden optischen Bauteile ist mindestens ein dispersionsveränderndes Mittel vorgesehen, das in einem Strahlengangabschnitt zwischen optischem Bauteil bzw. Strahlteiler und Mikroskopobjektiv angeordnet ist. Diese Mittel könnten beispielsweise Glaskörper sein, die eine Dispersion aufweisen, die gleich oder entgegengesetzt der Dispersion ist, die durch das oder die anderen Bauteile im Strahlengang verursacht wird.

[0039] In einer konkreten Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Beleuchtungslicht zumindest teilweise, vorzugsweise ganz, vor einem Mikroskopobjektiv aus dem Strahlengang ausblendbar ist. Dies könnte beispielsweise bei linearer Polarisierung des Beleuchtungslichts mit Hilfe eines Polarisators realisiert werden, wenn der Polarisator in seiner Transmissionsstellung senkrecht zur Polarisationsrichtung des linear polarisierten Lichts vor einem Mikroskopobjektiv angeordnet ist. Eine Winkелеinstellung des Polarisators über einen Bereich von 0 bis 90 Grad ermöglicht eine maximale bis hin zu einer minimalen Transmission des Beleuchtungslichts durch das entsprechende Mikroskopobjektiv.

[0040] In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein weiterer Detektor dem optischen Bauteil bzw. dem Strahlteiler nachgeordnet. Dieser weitere Detektor könnte noch den Anteil des Lichts detektieren, der trotz erfindungsgemäßer Vorkehrungen zur effizienten Detektion dennoch aus dem Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlengang austritt. Insbesondere bei der Transmissions-Polarisationsmikroskopie könnte der zusätzliche Detektor das vom Objekt in seiner Polarisationsrichtung nicht veränderte oder veränderte Licht detektieren, je nach dem ob in den Teilstrahlengängen Mittel zur Beeinflussung der Polarisationsrichtung vorgesehen sind oder nicht.

[0041] Falls ein Polarisationsstrahlteilerwürfel als den Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlengang teilendes bzw. vereinigendes Bauteil eingesetzt wird, ist in vorteilhafter Weise eine Seitenfläche des Polarisationsstrahlteilers zumindest teilweise verspiegelt. Es könnte sich hierbei um die Seitenfläche handeln, die beim erfindungsgemäßen Gebrauch des Transmissionsmikroskops nicht von Licht durchsetzt wird. Somit wird das Detektionslicht, das dem Detektor nach Durchsetzen dieser Fläche nicht mehr zugänglich

wäre zurück in den Strahlengang zurückreflektiert, so dass es nach einem weiteren Umlauf zumindest teilweise dem Detektor zugeführt werden kann.

[0042] Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die den Patentansprüchen 1 und 9 nachgeordneten Patentansprüche und andererseits auf die nachfolgende Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im Allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

[0043] Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Strahlengangs eines Mikroskops der gattungsbildenden Art,

[0044] Fig. 2 in einer schematischen Darstellung ein erstes Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Mikroskops,

[0045] Fig. 3 eine schematische Darstellung eines zweiten Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen Mikroskops,

[0046] Fig. 4 eine schematische Darstellung eines weiteren Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen Mikroskops und

[0047] Fig. 5 eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Mikroskops, eingebunden in das Gesamtsystem.

[0048] Fig. 5 und 1 zeigen ein Mikroskop mit einem Beleuchtungsstrahlengang 1 einer Lichtquelle 2, einem Detektionsstrahlengang 3 eines Detektors 4, einem den Detektionsstrahlengang 3 vereinigenden Bauteil 5 und zwei auf das Objekt 6 gerichtete Mikroskopobjektive 7, 8.

[0049] Bei dem in Fig. 5 gezeigten Mikroskop handelt es sich um ein konfokales Rastermikroskop, die Anregungslochblende 9 korrespondiert optisch zur Detektionslochblende 10, die beide optisch zur Fokalebene der Mikroskopobjektive korrespondieren. Der Beleuchtungsstrahlengang 1 wird mit dem Detektionsstrahlengang 3 mit Hilfe des Strahlteilers 11 koaxial zusammengeführt. Die Strahlblendenvorrichtung 12 lenkt den Beleuchtungs- und Detektionslichtstrahl in zwei im wesentlichen senkrecht zueinander stehenden Richtungen ab, so dass ein Objekt 6 zweidimensional abgetastet werden kann. Das in Fig. 5 schematisch gezeigte Mikroskopmodul 13 verkörpert schematisch eines der in den Fig. 2 bis 4 gezeigten Mikroskopmodule.

[0050] In Fig. 2 ist gezeigt, dass das erfindungsgemäße Mikroskop ein im Strahlengang 1, 3 angeordnetes Bauteil 14 aufweist, das in seiner Eigenschaft auf einen Teil des Beleuchtungs- und Detektionsstrahlquerschnitts derart wirkt, dass das vereinigte Detektionslicht 15, 16 weitgehend verlustfrei zum Detektor 4 geleitet wird.

[0051] Das optische Bauteil 14 beeinflusst im wesentlichen 50% des Gesamtstrahlquerschnitts, insbesondere detektionsseitig den Bereich des Detektionslichts 15. Das optische Bauteil 14 ist als Spiegel ausgeführt, wobei die dem Detektionslicht im Bereich 15 zugewandte Seite eine verspiegelte Schicht ist, die auf einer verspiegelten Glasplatte aufgebracht ist. Der Bereich der nicht beschichteten Glasplatte ist punktiert dargestellt und wird von dem Detektionslicht 16 durchschritten.

[0052] Das optische Bauteil 14 teilt den Beleuchtungsstrahl 1 derart auf, dass die Eintrittspupillen 17, 18 der beiden Mikroskopobjektive 7, 8 zumindest weitgehend ausgeleuchtet sind. Die punktiert eingezeichneten ursprünglichen Spiegelpositionen 34, 35 der Spiegel 27, 28, die den Spiegelpositionen der Anordnung aus Fig. 1 entsprechen, würden zur weitgehenden Ausleuchtung der Eintrittspupillen

17, 18 der beiden Mikroskopobjektive 7, 8 nicht geeignet sein. Dementsprechend befinden sich die beiden Spiegel 27, 28 an der in Fig. 2 eingezeichneten Position.

[0053] Das von dem Objekt 6 kommende Licht 15, 16 verläuft nach dem optischen Bauteil parallel.

[0054] Die Fig. 3, 4 und 5 zeigen ein Mikroskop mit einem Beleuchtungsstrahlengang 1, einer Lichtquelle 2, einem Detektionsstrahlengang 3 eines Detektors 4, einem den Detektionsstrahlengang 3 vereinigenden Bauteil 5 und zwei auf das Objekt 6 gerichtete Mikroskopobjektive 7, 8.

[0055] Erfindungsgemäß ist ein im Strahlengang angeordneter und auf den gesamten Teil des Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlquerschnitts wirkender Polarisationsstrahlteiler 19 vorgesehen.

[0056] In Fig. 4 ist zwischen der dort nicht eingezeichneten Lichtquelle und dem Polarisationsstrahlteiler 19 eine  $\lambda/2$ -Platte 20 angeordnet, die im wesentlichen 50% des Strahlquerschnitts beeinflusst, der mit dem Bezugszeichen 21 eingezeichnet ist.

[0057] Die  $\lambda/2$ -Platte 20 ist in einer korrespondierenden Ebene 22 zu den Eintrittspupillen 17, 18 der beiden Mikroskopobjektive 7, 8 angeordnet. In den Fig. 3 und 4 sind in jedem Teilstrahlengang 23, 24 jeweils Mittel 25, 26 vorgesehen, die in Form von  $\lambda/4$ -Platten ausgeführt sind, die die Polarisation des Lichts beeinflussen.

[0058] Das Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 3 zeigt ein Transmissions-Polarisationsmikroskop, bei dem linear polarisiertes Beleuchtungslicht 1 der Lichtquelle 2 auf den Polarisationsstrahlteiler 19 trifft. Aufgrund der Orientierung der Polarisationsrichtung des Beleuchtungslichts 1 kann das Beleuchtungslicht 1 in den Polarisationsstrahlteiler nahezu verlustfrei passieren und durchläuft die  $\lambda/4$ -Platte 25 in Richtung Spiegel 27. Spiegel 27 reflektiert das Beleuchtungslicht 1 in Richtung des Mikroskopobjektivs 7, das das Beleuchtungslicht 1 in das Objekt 6 fokussiert. Das durch das Objekt 6 hindurchgetretene Beleuchtungslicht 1 wird vom Mikroskopobjektiv 8 aufgeammelt und in Richtung Spiegel 28 geleitet. Das am Spiegel 28 reflektierte Transmissionslicht durchläuft eine weitere  $\lambda/4$ -Platte 26, wonach das Transmissionslicht im wesentlichen eine Polarisationsrichtung aufweist, die senkrecht zur Polarisationsrichtung des Beleuchtungslichts 1 steht. Die Drehung der Polarisationsrichtung wurde durch die beiden  $\lambda/4$ -Platten 25, 26 verursacht. Das Transmissionslicht wird aufgrund seiner gedrehten Polarisationsrichtung am Polarisationsstrahlteiler 19 in Richtung des Spiegels 29 reflektiert, der wiederum das Transmissionslicht in Richtung des Detektors 4 reflektiert.

[0059] Die Fig. 4 zeigt ein konfokales Transmissions- und Polarisationsmikroskop, mit dem das Objekt 6 von beiden Seiten – also von Mikroskopobjektiv 7 und Mikroskopobjektiv 8 – beleuchtet wird.

[0060] Im Beleuchtungsstrahlengang 1 des in Fig. 4 gezeigten Mikroskopmoduls befindet sich eine in der Ebene 22 angeordnete  $\lambda/2$ -Platte 20, die ca. 50% des Strahlquerschnitts des Beleuchtungsstrahlengangs 1 beeinflusst. Somit wird die Polarisationsrichtung des die  $\lambda/2$ -Platte 20 durchlaufenden linear polarisierten Lichts um 90 Grad gedreht. Das am Spiegel 29 reflektierte Beleuchtungslicht 1 trifft auf den Polarisationsstrahlteiler 19, der derart ausgerichtet bzw. orientiert ist, dass er das die  $\lambda/2$ -Platte durchlaufende Licht in Richtung des Spiegels 27 transmittieren und das die  $\lambda/2$ -Platte nicht durchlaufende Licht zum Spiegel 28 reflektieren läßt. Dieses Beleuchtungslicht durchläuft wiederum jeweils eine  $\lambda/4$ -Platte 25 bzw. 26, die im Teilstrahlengang 23 bzw. 24 vor den Mikroskopobjektiven 7, 8 angeordnet sind. Das den Teilstrahlengang 23 durchlaufende Beleuchtungslicht wird nachdem es die erste  $\lambda/4$ -Platte 25, das Mikroskopobjektiv 7, das Objekt 6, das Mikroskopobjektiv 8 und die

zweite  $\lambda/4$ -Platte 26 durchlaufen hat um weitere 90 Grad gedreht. Dieses Transmissionslicht wird nunmehr am Spiegel 28 in Richtung des Polarisationsstrahlteilers 19 reflektiert. Aufgrund der gedrehten Polarisationsrichtung wird dieses Transmissionslicht nun am Polarisationsstrahlteiler 19 in Richtung des Spiegels 29 reflektiert, der das den Teilstrahlengang 24 durchlaufende Transmissionslicht in die Richtung des nicht eingezeichneten Detektors 4 reflektiert. Das am Polarisationsstrahlteiler 19 zunächst reflektierte Beleuchtungslicht 1 des nicht von der  $\lambda/2$ -Platte 20 beeinflussten Lichts durchläuft zunächst den Teilstrahlengang 24 und nach Hindurchtreten der  $\lambda/4$ -Platte 26 des Mikroskopobjektivs 8, des Objekts 6, des Mikroskopobjektivs 7 und der  $\lambda/4$ -Platte 25 ist dieses Transmissionslicht in seiner Polarisationsrichtung um 90 Grad gedreht. Nach der Reflexion am Spiegel 27 weist das den Teilstrahlengang 23 durchlaufende Transmissionslicht eine Polarisationsrichtung auf, die den Polarisationsstrahlteiler 19 in Richtung des Spiegels 29 passieren kann. Auch dieses Transmissionslicht wird in Richtung des nicht eingezeichneten Detektors 4 reflektiert.

[0061] Die in Fig. 5 gezeigte Lichtquelle 2 ist ein Lasersystem, das aus einem Argon-Krypton-Laser besteht, der Licht dreier unterschiedlicher Wellenlängen simultan emittieren kann. Weiterhin umfasst die Lichtquelle 2 eine gepulste Laserlichtquelle, die Laserlicht emittiert, mit dem Mehrphotonenfluoreszenz anregbar ist.

[0062] Die in den Fig. 1 bis 4 gezeigten Ausführungsbeispiele fokussieren das Beleuchtungslicht 1 in das Objekt 6. Die Strahlblenkvorrichtung 12 lenkt den Beleuchtungslichtstrahl 1 in zwei im wesentlichen senkrecht zueinander stehenden Richtungen ab, so dass der Beleuchtungsfokus relativ zum Objekt bewegt werden kann, wodurch das Objekt zweidimensional abgetastet werden kann. Eine Bewegung entlang der optischen Achse der nicht eingezeichneten Objektaufnahmeverrichtung ermöglicht eine dreidimensionale Datenaufnahme, wie sie bei der konfokalen Rastermikroskopie üblich ist.

[0063] Bei dem Ausführungsbeispiel der Fig. 2 handelt es sich bei dem detektierten Licht um Fluoreszenzlicht, bei den Ausführungsbeispielen der Fig. 3 und 4 handelt es sich bei dem detektierten Licht um Transmissionslicht.

[0064] Als Detektor 4 ist eine Photomultiplier-Anordnung vorgesehen, die mehrere Detektionskanäle aufweist, womit Licht aus unterschiedlichen spektralen Bereichen detektiert werden kann.

[0065] Die Mikroskopobjektive 7, 8 sind bezüglich des Objekts bzw. einer gemeinsamen Fokalebene einander entgegengesetzt angeordnet.

[0066] Das in Fig. 2 gezeigte Ausführungsbeispiel ist als ein doppelkonfokales Rastermikroskop ausgeführt, mit dem beleuchtungsseitig wie auch detektionsseitig interferometrisch gearbeitet wird. Zur interferometrischen Beleuchtung ist hierbei der Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang 1, 3 auf die Kohärenzeigenschaften des Beleuchtungs- und Detektionslichts abgestimmt. Hierzu sind zwei phasenverändernde Mittel 30, 31 vorgesehen, die jeweils im Teilstrahlengang 23 bzw. 24 angeordnet sind. Mit den phasenverändernden Mitteln 30, 31 kann zum einen das Beleuchtungslicht derart eingestellt werden, dass im Beleuchtungsfokus der beiden Mikroskopobjektive 7, 8 konstruktive Interferenz vorliegt, zum anderen kann mit den phasenverändernden Mitteln 30, 31 der Weglängenunterschied der beiden Teilstrahlengänge 23, 24 ausgeglichen werden. Dieser Weglängenunterschied ergibt sich dadurch, dass die eine Hälfte 15 des Beleuchtungsstrahlengangs 1 an dem verspiegelten Bereich der Glasplatte 14 reflektiert, der andere Teil 16 des Beleuchtungsstrahlengangs 1 die Glasplatte jedoch durchläuft. Hierdurch ist ein unterschiedlicher optischer Weg der bei-

den Teilstrahlengänge 23, 24 gegeben. Die Kohärenzlänge des Beleuchtungs- und des Detektionslichts ist größer als die Weglängendifferenz zwischen den Teilstrahlengängen 23, 24.

[0067] In Fig. 3 ist ein weiterer Detektor 32 gezeigt, der das den Teilstrahlengang 24 durchlaufende Transmissionslicht, das nicht von dem Polarisationsstrahlteiler 19 in Richtung des Spiegels 29 reflektiert wird, detektiert. Der Detektor 32 detektiert bei diesem Mikroskopaufbau das vom Objekt 6 in seiner Polarisationsrichtung veränderte Licht. Mit den Ausführungsbeispielen gemäß den Fig. 3 und 4 können somit Doppelbrechungsmessungen an Objekten durchgeführt werden.

[0068] In Fig. 1 ist mit dem Bezugszeichen 33 der verspiegelte Bereich angedeutet, der den Teil des Lichts, der in Richtung dieser Fläche propagiert, wieder zurück in die Teilstrahlengänge 23, 24 reflektiert. Somit kann bei fluoreszenzmikroskopischen Anwendungen die Fluoreszenzlichtausbeute erhöht werden, geeignete Unterdrückungsmethoden für die durch die Mehrfachreflexion der verspiegelten Fläche 33 bedingten Störbeiträge, vorausgesetzt. In den Fig. 1 und 4 sind Linsen 36 vorgesehen, die eine Zwischenabbildung ermöglichen. Da der Lichtstrahl an dieser Stelle nicht kollimiert verläuft, könnte der verspiegelte Bereich konvex oder konkav ausgebildet sein, so dass der auf die Fläche 33 zulaufende Lichtstrahl nach der Reflexion in sich selbst zurückreflektiert wird. Alternativ könnte das Bauteil 5 keinen verspiegelten Bereich aufweisen. Der aus dem Bauteil 5 austretende Strahl könnte dann mit Hilfe einer dem Bauteil 5 nachgeordneten Linsen- und Spiegelanordnung in sich reflektiert werden.

[0069] Abschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass die voranstehend erörterten Ausführungsbeispiele lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dienen, diese jedoch nicht auf die Ausführungsbeispiele einschränken.

#### Bezugszeichenliste

1	Beleuchtungsstrahlengang	40
2	Lichtquelle	
3	Detektionsstrahlengang	
4	Detektor	
5	ein den (3) vereinigendes Bauteil	
6	Objekt	45
7	Mikroskopobjektiv	
8	Mikroskopobjektiv	
9	Anregungslochblende	
10	Detektionslochblende	
11	Strahlteiler	50
12	Strahlblenkvorrichtung	
13	Interferenzmodul	
14	optisches Bauteil	
15	vereinigtes Detektionslicht	
16	vereinigtes Detektionslicht	55
17	Eintrittspupille von (7)	
18	Eintrittspupille von (8)	
19	Polarisationsstrahlteiler	
20	$\lambda/2$ -Platte	
21	von (20) beeinflusster Teil des Lichtstrahls	60
22	zu (17) oder (18) korrespondierende Ebene	
23	Teilstrahlengang zwischen (5) und (7)	
24	Teilstrahlengang zwischen (5) und (8)	
25	Mittel zur Beeinflussung der Polarisation	
26	Mittel zur Beeinflussung der Polarisation	65
27	Spiegel	
28	Spiegel	
29	Spiegel	

30	Phasenverändernde Mittel
31	Phasenverändernde Mittel
32	weiterer Detektor
33	verspiegelter Bereich von (5)
34	ursprüngliche Spiegelposition von (27)
35	ursprüngliche Spiegelposition von (28)
36	Linsen

#### Patentansprüche

1. Mikroskop mit einem Beleuchtungsstrahlengang (1) einer Lichtquelle (2), einem Detektionsstrahlengang (3) eines Detektors (4), einem den Detektionsstrahlengang (3) vereinigenden Bauteil (5) und mindestens zwei auf das Objekt (6) gerichtete Mikroskopobjektive (7, 8), dadurch gekennzeichnet, dass ein im Strahlengang (1, 3) angeordnetes optisches Bauteil (14) in seiner Eigenschaft auf einen Teil des Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlquerschnitts derart wirkt, dass das vereinigte Detektionslicht (15, 16) weitgehend verlustfrei zum Detektor (4) geleitet wird.
2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der wirksame Teil des optischen Bauteils (14) im wesentlichen 50% des Gesamtstrahlquerschnitts beeinflusst.
3. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil (14) einen Spiegel, einen dichroitischen Strahlteiler und/oder einen Polarisationsstrahlteiler umfasst.
4. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil (14) nur zu einem dem wirksamen Anteil entsprechenden Teil beschichtet bzw. verspiegelt ist.
5. Mikroskop nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil (14) eine teilweise verspiegelte Glasplatte ist.
6. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil (14) den Beleuchtungsstrahl (1) derart aufteilt, dass die Eintrittspupillen (17, 18) der Mikroskopobjektive (7, 8) zumindest weitgehend ausleuchtbar sind.
7. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das vom Objekt (6) kommende Licht (15, 16) nach dem optischen Bauteil (5) zumindest weitgehend parallel verläuft.
8. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Bauteil (5) in einer korrespondierenden Ebene einer zur Eintrittspupille (17, 18) mindestens eines Mikroskopobjektivs (7, 8) angeordnet ist.
9. Mikroskop mit einem Beleuchtungsstrahlengang (1) einer Lichtquelle (2), einem Detektionsstrahlengang (3) eines Detektors (4), einem den Detektionsstrahlengang (3) vereinigenden Bauteil (5) und mindestens zwei auf das Objekt (6) gerichtete Mikroskopobjektive (7, 8), dadurch gekennzeichnet, dass ein im Strahlengang angeordneter und auf den gesamten Teil des Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlquerschnitts wirkender Polarisationsstrahlteiler (19) vorgesehen ist.
10. Mikroskop nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen Lichtquelle (2) und Strahlteiler (19) eine  $\lambda/2$ -Platte (20) angeordnet ist, die im wesentlichen 50% des Strahlquerschnitts beeinflusst.
11. Mikroskop nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die  $\lambda/2$ -Platte (20) in einer korrespondierenden Ebene (22) zu einer Eintrittspupille (17, 18) mindestens eines Mikroskopobjektivs (7, 8) angeordnet ist.



net ist.

12. Mikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein die Polarisationsrichtung beeinflussendes Mittel (25, 26) in einem Strahlengangabschnitt (23, 24) zwischen Strahlteiler (5) und einem Mikroskopobjektiv (7, 8) vorgesehen ist. 5
13. Mikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel (25, 26) eine  $\lambda/2$ -Platte oder zwei  $\lambda/4$ -Platten umfasst. 10
14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem Detektor (4) und der  $\lambda/2$ -Platte (20) ein weiterer Strahlteiler (11) angeordnet ist, über den das vom Objekt (6) kommende Licht einem Detektor (4) zugeführt wird. 15
15. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass Filter und polarisationsbeeinflussende Mittel (25, 26) in dem Strahlteiler (5) integrierbar sind.
16. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass als Lichtquelle (2) mindestens ein Laser vorgesehen ist. 20
17. Mikroskop nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Laserlichtquelle (2) gepulstes Licht emittiert. 25
18. Mikroskop nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass mit der gepulsten Lichtquelle (2) Mehrphotonen-Fluoreszenz anregbar ist.
19. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass als Lichtquelle (2) eine Lampe vorgesehen ist, vorzugsweise eine Quecksilber- oder Xenonlampe. 30
20. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht (1) in das Objekt (6) fokussiert wird. 35
21. Mikroskop nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass durch Ablenkung des Beleuchtungslichtstrahls (1) von einer Strahlablenkvorrichtung (12) der Beleuchtungsfokus relativ zum Objekt (6) bewegbar ist. 40
22. Mikroskop nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass durch eine Bewegung des Objekts (6) relativ zu dem Beleuchtungsfokus das Objekt (6) abtastbar ist.
23. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht (1) eine Objektebene ausleuchtet. 45
24. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass das detektierte Licht Reflexions-, Transmissions- und/oder Fluoreszenzlicht ist. 50
25. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor (4) einen CCD-Chip, eine CCD-Zeile, einen Photomultiplier, eine Photodiode und/oder eine Avalanche-Photodiode umfasst. 55
26. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroskopobjektive (7, 8) bezüglich des Objekts (6) oder einer gemeinsamen Fokalebene einander entgegengesetzt angeordnet sind.
27. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass die optischen Achsen zweier Mikroskopobjektive einen Winkel einschließen, der zwischen 0 und 180 Grad liegt. 60
28. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop als ein Rastermikroskop, vorzugsweise als ein konfokales Rastermikroskop, ausgeführt ist. 65
29. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 27, da-

durch gekennzeichnet, dass das Mikroskop als ein doppelkonfokales Rastermikroskop ausgeführt ist.

30. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop als ein Wellenfeldmikroskop ausgeführt ist.
31. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop als ein  $I^1M$ -,  $I^3M$ - oder ein  $I^2M$ -Mikroskop ausgeführt ist.
32. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroskop als ein Theta-Mikroskop ausgeführt ist.
33. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Kohärenzlänge des Beleuchtungs- und/oder Detektionslichts größer oder gleich der Weglängendifferenz zwischen den jeweiligen Strecken (23, 24) vom Mikroskopobjektiv (7, 8) zum optischen Bauteil (5) bzw. Strahlteiler (19) ist.
34. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Kohärenzlänge des Beleuchtungs- und/oder Detektionslichts kleiner der Weglängendifferenz zwischen den jeweiligen Strecken (23, 24) vom Mikroskopobjektiv (7, 8) zum optischen Bauteil (5) bzw. Strahlteiler (19) ist.
35. Mikroskop nach Anspruch 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlengang auf die Kohärenzeigenschaften des Beleuchtungs- und/oder Detektionslichts abstimmbaar ist.
36. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein phasenveränderndes Mittel (30, 31) in einem Strahlengangabschnitt (23, 24) zwischen optischem Bauteil (5) bzw. Strahlteiler (19) und Mikroskopobjektiv (7, 8) angeordnet ist.
37. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein phasenveränderndes Mittel (30, 31) vorgesehen ist, mit dem die Phasenbeziehung des Beleuchtungs- und/oder Detektionslichts für unterschiedliche Punkte in der Fokalebene veränderbar ist.
38. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Einrichtung zum definierten Verschieben und/oder Verkippen eines Mikroskopobjektivs (8) vorgesehen ist.
39. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 38, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein dispersionsveränderndes Mittel in einem Strahlengangabschnitt (23, 24) zwischen optischem Bauteil (5) bzw. Strahlteiler (19) und Mikroskopobjektiv (7, 8) angeordnet ist.
40. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 39, dadurch gekennzeichnet, dass Beleuchtungslicht zumindest teilweise, vorzugsweise ganz, vor einem Mikroskopobjektiv (7, 8) aus dem Strahlengang ausblendbar ist.
41. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 40, dadurch gekennzeichnet, dass ein weiterer Detektor (32) dem optischen Bauteil (5) bzw. dem Strahlteiler (19) nachgeordnet ist.
42. Mikroskop nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, dass der zusätzliche Detektor (32) das vom Objekt (6) in seiner Polarisationsrichtung veränderte Licht detektiert.
43. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 42, dadurch gekennzeichnet, dass eine Seitenfläche (33) eines als Strahlteiler (5) eingesetzten Strahlteilerwürfels

zumindest teilweise verspiegelt ist.

---

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

---

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

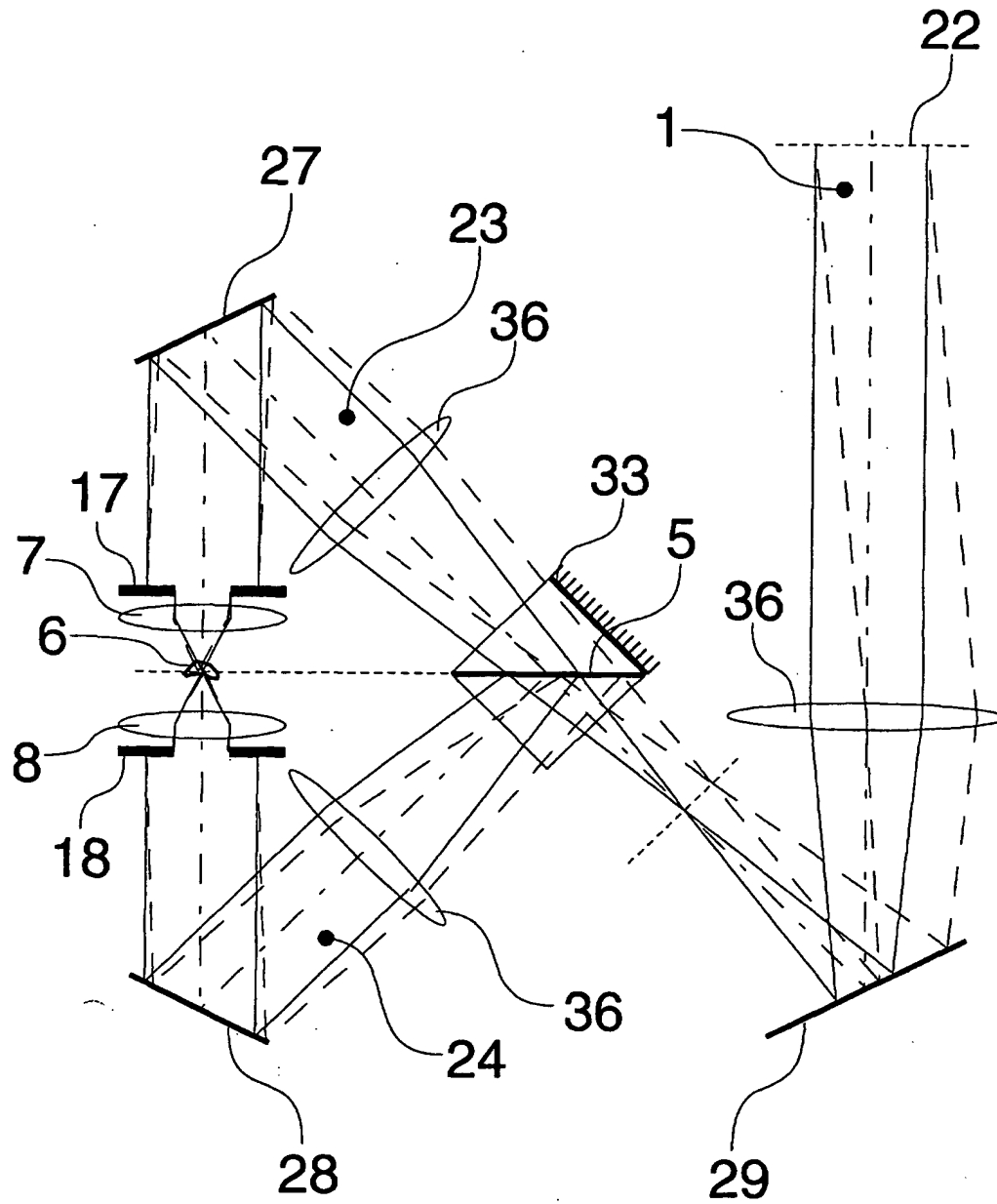


Fig. 1

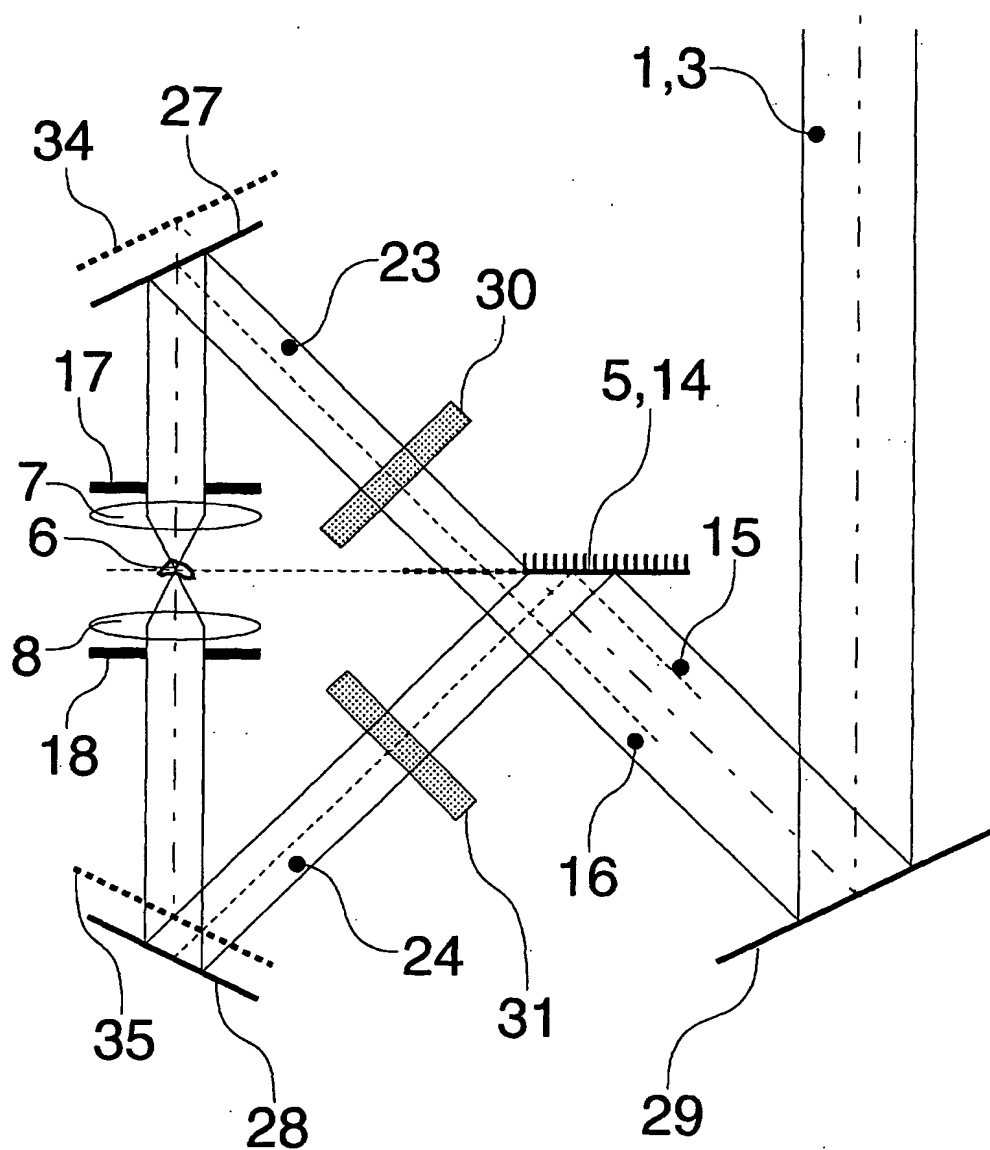


Fig. 2

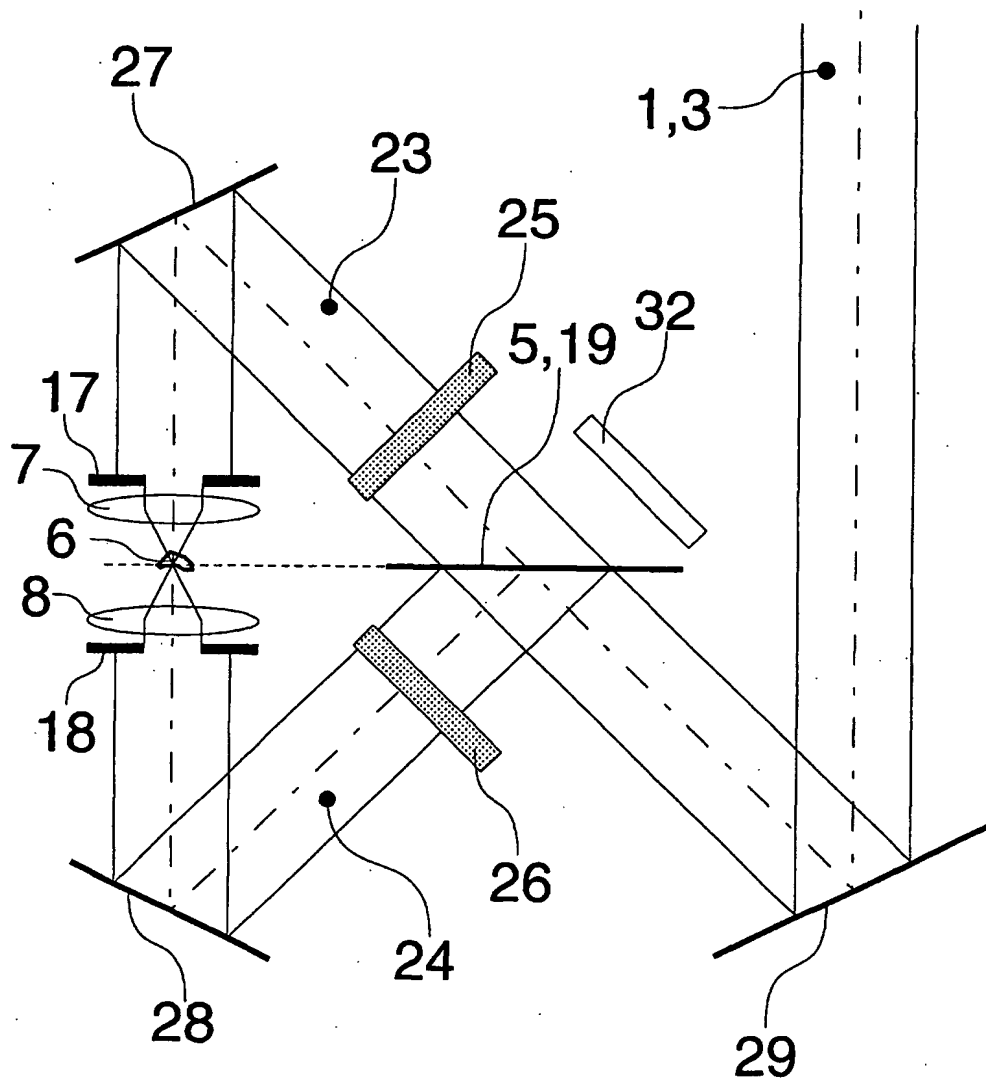


Fig. 3

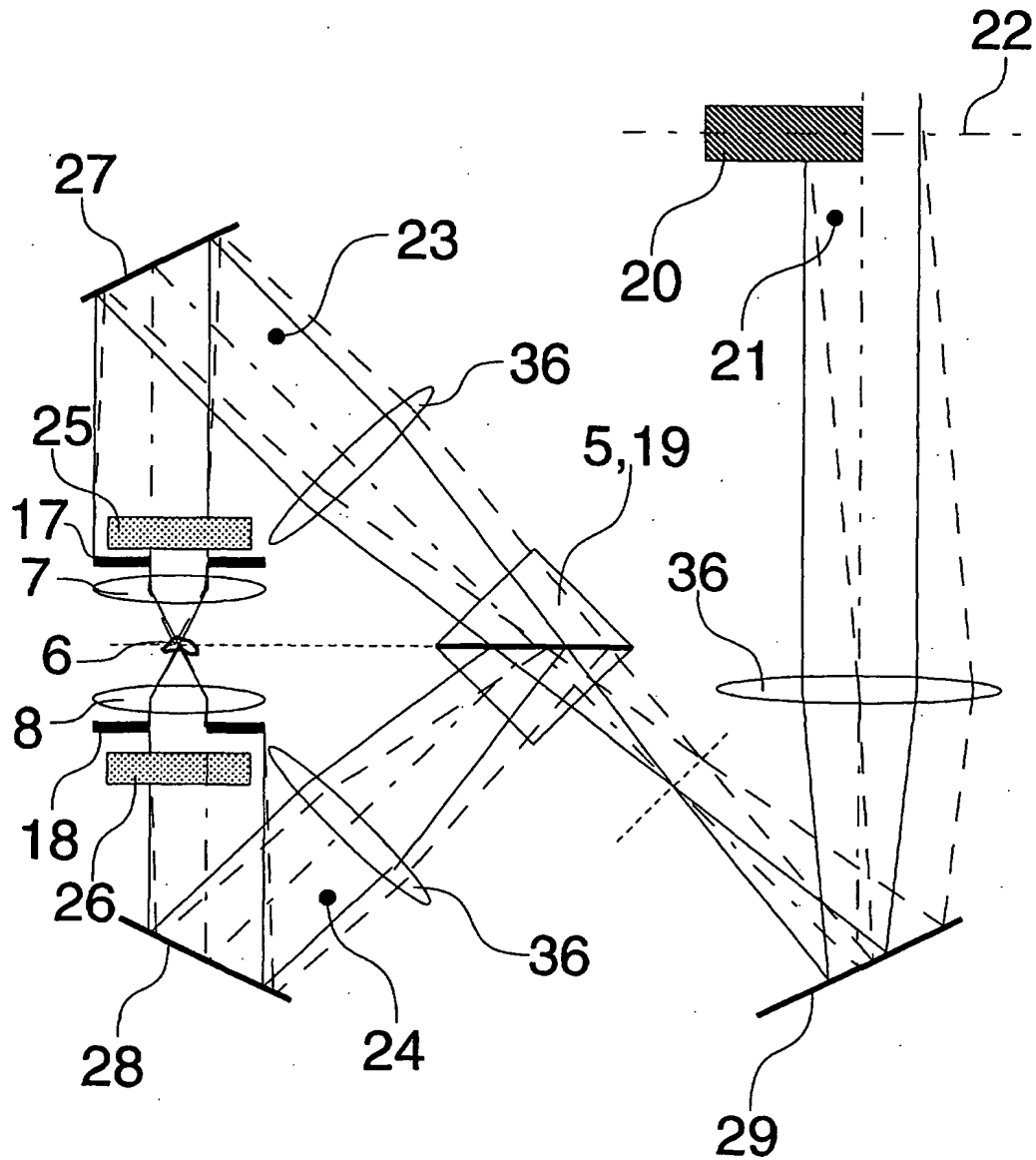


Fig. 4

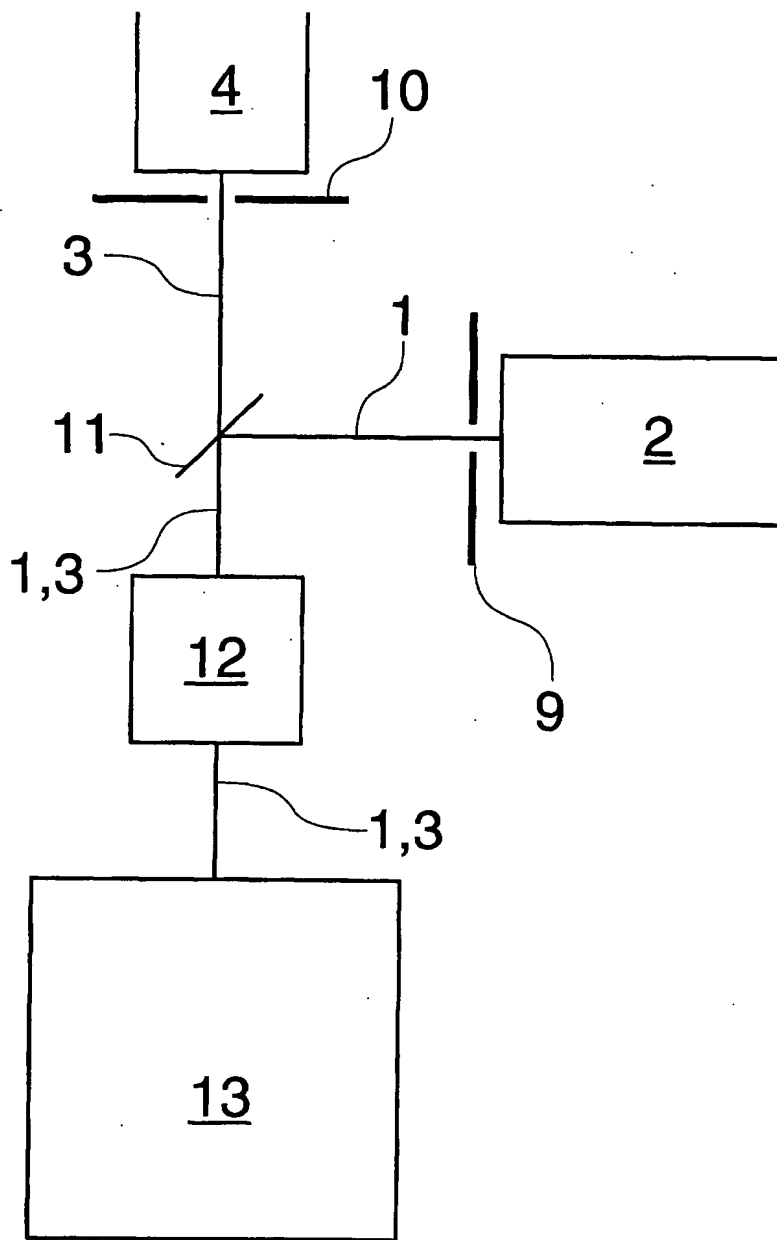


Fig. 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**